

Uso de la Idebenona para preparar una composición despigmentante de uso tópico y composición correspondiente

5

La presente invención se refiere al uso de la idebenona en una composición destinada a ser aplicada sobre la piel, con el objeto de inhibir la melanogénesis. Asimismo, se refiere a una composición destinada a la aplicación tópica sobre la  
10 piel, que comprende una cantidad cosmética, farmacéuticamente y/o dermatológicamente efectiva de idebenona, sus derivados o mezclas de los mismos. En particular, la presente invención se refiere a una preparación cosmética capaz de conferir un efecto beneficioso en los procesos de hiperpigmentación  
15 cutánea.

De preferencia, la presente invención se refiere a preparaciones cosméticas farmacéuticas o dermatológicas que comprenden idebenona y/o sus derivados, y que disminuyen el  
20 aumento local de la coloración de la piel causada por un incremento en la producción de melaninas. Particularmente, la presente invención se refiere a una preparación cosmética o dermatológica utilizable en el tratamiento de las hiperpigmentaciones cutáneas provocadas por estímulos  
25 hormonales y/o por injurias físicas, químicas y/o biológicas. La invención también se refiere a una composición farmacéutica de uso tópico que comprende idebenona como un ingrediente aclarador cutáneo.

### Antecedentes de la invención

La melanina es un pigmento oscuro que se encuentra en la piel, el pelo, los ojos y en ciertas células nerviosas, el  
5 cual es producido en células llamadas melanocitos.

Los melanocitos son células de origen neuroectodérmico originadas en las crestas neurales del embrión que, durante la etapa fetal, migran hacia la capa basal de la epidermis.  
10 Asimismo, existen melanocitos extracutáneos esparcidos en otros tejidos.

Los melanocitos epidermotropos llegan en etapa fetal a las capas más profundas de la epidermis, localizándose entre las  
15 células basales, a razón de aproximadamente 1 melanocito por cada 10 células basales, sin importar la raza del portador. Una vez en su posición definitiva, estas células emiten prolongaciones ramificadas denominadas dendritas, de manera tal que todas las células basales contactan con estas  
20 prolongaciones.

La función primordial del melanocito es la de sintetizar un pigmento oscuro denominado melanina. Dicho pigmento se acumula en el citoplasma del melanocito en estructuras  
25 ovoides similares a gránulos de secreción, llamados melanosomas, que luego de formarse en el cuerpo celular, migran a través del citoesqueleto del melanocito hacia las dendritas. Este proceso está controlado hormonalmente, existiendo hormonas que promueven la formación de melanina y  
30 otras que la inhiben, como así también hormonas que promueven

la movilización de melanosomas hacia la periferia de las dendritas y otras que los concentran alrededor del núcleo. Este proceso resulta ser por demás evidente en animales inferiores, aunque en el humano también puede existir.

5

Los extremos libres de las dendritas del melanocito se introducen en el citoplasma de los queratinocitos basales, literalmente inyectando melanosomas en el citoplasma de estas células. Así, toda la capa basal epidérmica y el folículo piloso contienen melanina distribuida uniformemente, por una parte debido a la presencia de melanosomas en los melanocitos y por otra y en gran medida, debido a la incorporación de melanosomas en el queratinocito basal, conocido circunstancialmente como melanóforo. Lo llamativo de este proceso es que cuando el queratinocito basal pigmentado (melanóforo) se divide para dar lugar a células diferenciadas espinosas, más superficiales, los melanosomas se pierden, y, por otro lado, las dendritas del melanocito no inyectan melanosomas en células espinosas diferenciadas. Esos melanosomas perdidos pueden alojarse en el espacio intercelular de la epidermis, y luego ser eliminados junto con la descamación ordinaria de la piel. Esos melanosomas están completamente degradados y ya no cumplen con su función pigmentante.

25

El color de la piel humana normal está relacionado directamente con el tamaño, la configuración, el tipo y el color de los melanosomas, y con su distribución en los melanocitos y los queratinocitos. La síntesis de melanina

tiene lugar exclusivamente en los melanosomas y depende de la acción de numerosos genes.

5 Cada melanosoma es un organoide esférico u ovoide, conformado por una membrana celular lipoproteica trilaminar, una matriz amorfa con agua, electrolitos y diferentes solutos, en la cual se encuentran diluidas enzimas activas y una ultra estructura proteica de tubulina que forma túbulos intra membranosos de disposición más o menos paralela entre sí.

10

Hasta no hace mucho tiempo, se consideraba que los melanosomas estaban compuestos sólo por melanina y melanoproteína producto de la interacción con la tirosinasa. Estudios recientes demostraron que los melanosomas contienen  
15 dos fracciones diferentes, una lipídica con lípidos localizados en el exterior del melanosoma y otra proteica con proteínas estructurales que constituyen la parte central del melanosoma. La fracción lipídica es importante en la regulación funcional del melanosoma, mientras que las  
20 proteínas de la matriz controlan su diferenciación estructural.

El proceso para la formación de melanosomas y su melanización puede ser considerado como una "cascada" de eventos  
25 canalizados por controles reguladores internos que entran en juego a medida que los melanosomas son programados para cumplir sus funciones. Dicho proceso puede resumirse de la siguiente manera:

i) Formación y organización de los componentes melanosómicos: Las proteínas estructurales y enzimáticas de los melanosomas son formadas en el interior de las vacuolas de la membrana del melanosoma. En un estadio temprano, las membranas siguen incorporando proteínas y lípidos específicos. En el interior de las vacuolas formadas en el retículo endoplásmico liso se vuelcan proteínas formadas en el retículo endoplásmico rugoso, que se ordenan en túbulos, laminillas y filamentos sin una organización arquitectural definida. Además, se van incorporando microvesículas formadas en el aparato de Golgi, conteniendo enzimas o factores reguladores post-tirosinasa (como por caso la dopacromo-tautomerasa), que se fusionan con la membrana limitante. La tirosinasa es incorporada luego de su glucosilación en el complejo de Golgi.

Con el transcurso del tiempo, proteínas estructurales se siguen incorporando al melanosoma, mientras que otro tanto ocurre con la tirosinasa. Las proteínas estructurales formarán parte de la membrana del melanosoma, y luego van a pasar a la matriz.

ii) Conversión en eumelanosomas y feomelanosomas: La vía que seguirán a partir de aquí los melanosomas, dependerá de los niveles de cisteína y/o de los compuestos con grupos sulfhidrilos (e.g. glutatión) que se encuentren en el interior del melanosoma. Si los niveles son bajos, se producirá la estimulación de la eumelanogénesis con formación de eumelanosomas. En este caso, las laminillas se convertirán en el componente predominante de la matriz y se dispondrán en forma paralela. La tirosinasa será transferida desde el

aparato de Golgi y se fijará a las vesículas y laminillas ya formadas. En ausencia de un nivel inhibidor de cisteína, la tirosinasa desencadenará la síntesis de melanina a partir de la conversión de tirosina en dopaquinona. La dopaquinona será  
5 convertida en eumelanina por procesos de auto-oxidación, además de los regulados por el factor de conversión de dopacromo. Aparentemente, la indol-5,6-quinona es polimerizada con varios de sus precursores para formar melanina en el interior de los melanosomas. Por otra parte,  
10 si los niveles de cisteína son elevados, se formará el feomelanosoma y la feomelanina será depositada sobre un conglomerado de microfilamentos y vesículas aún no estructurados. La tirosinasa convertirá la tirosina en dopaquinona, pero ésta difundirá hacia la matriz y se  
15 combinará con la cisteína, formando cisteinil-dopa, modificada ulteriormente para formar feomelanina. La cisteinil-dopa compite con la dopaquinona, desviando así su metabolismo, sin alterar la actividad de tirosinasa. La actividad post-tirosinasa es luego inhibida por la presencia  
20 del metabolito 5,6-hidroxiindol que no permite la síntesis de indol-5-6-quinona, lo que disminuye la velocidad de melanogénesis, permitiendo que la dopaquinona se acumule en la matriz, impidiendo una síntesis normal de eumelanina. En  
25 otras palabras, la cisteína actuaría como una sustancia tóxica para el melanosoma, inhibiendo ciertos pasos enzimáticos que bloquean una normal conversión de intermediarios en melanina verdadera, perdiéndose también la posibilidad de la melanina de anclarse a las proteínas estructurales del melanosoma.



iii) Transferencia y degradación: Los melanosomas son transferidos desde el sitio de su síntesis, en el pericario, hacia los extremos de las dendritas por la acción de los movimientos contráctiles del citoesqueleto del melanocito, en un proceso selectivo para melanosomas. Una vez iniciada la transferencia de melanosomas al interior de los queratinocitos, estas últimas células fagocitan los extremos libres de las dendritas conteniendo los melanosomas y luego ocurre un fenómeno de fusión de membranas, liberándose los melanosomas al interior del citoplasma del queratinocito. Los melanosomas son incorporados al queratinocito en lisosomas secundarios. Allí, enzimas lisosomas comenzarán a degradar al melanosoma y sus componentes se diluirán en el citoplasma, pudiendo ser reutilizados al incorporarse a un pool de sustratos metabólicos. Una de las características más importantes de esta degradación, es el pasaje de la melanina de un estado oxidado a un estado reducido, disminuyendo la intensidad del color.

De esta manera se completa el ciclo del melanosoma, comenzando por su síntesis en el melanocito, transfiriéndose al queratinocito y por último degradándose, en un proceso continuo, que asegura una uniformidad de distribución del pigmento.

25

La pigmentación melánica de la piel puede dividirse en varios componentes causales: 1) la melanina cutánea generada de acuerdo a programas genéticos en ausencia de exposición a rayos ultravioletas (color de la piel constitutivo) y 2) las reacciones de bronceado inmediato y retardado inducida por

30

exposición directa de la piel a la radiación UV (color de la piel facultativo). Los cambios del color facultativo resultan de la consecuencia de una interacción compleja entre la luz solar, las hormonas y la capacidad de bronceado dependiente  
5 de la constitución genética individual.

La coloración constitutiva de la piel, cabello y ojos está determinada genéticamente por varios genes, siendo éstos últimos carentes de una dominancia manifiesta. Además, existe  
10 una alta tendencia a la mutación espontánea de estos genes, por lo que no es infrecuente encontrar individuos con más de una población melanocítica, transformándose en mosaicos para este rasgo.

15 Aunque las poblaciones de melanocitos en la piel humana presentan variaciones regionales, todos los seres humanos, independientemente del color de su piel, poseen aproximadamente la misma cantidad de melanocitos epidérmicos en un área anatómica dada. En consecuencia, las diferencias  
20 étnicas del color de la piel se deben principalmente a diferencias de las propiedades de los melanosomas y no a la cantidad de melanocitos.

En el interior de los melanocitos de la piel no expuesta, la  
25 cantidad de melanosomas es mayor en afroamericanos, en negros de África y en aborígenes australianos (grupo 2) que en los norteamericanos blancos de descendencia europea y los asiáticos (grupo 1). La mayor parte de los melanosomas se encuentran en los estadios de formación II y III, en los  
30 individuos del grupo 1, mientras que en los del grupo 2, una



proporción importante de los melanosomas ya está melanizados en su totalidad (estadio IV). Los melanosomas no sólo son más numerosos en los queratinocitos del grupo 2 sino que además son de mayor tamaño.

5

Otras diferencias genéticas y raciales en el color constitutivo están dadas por la cantidad de feomelanina con relación a la de eumelanina. La feomelanina adopta un color más claro, rojizo, mientras que la eumelanina es negra. Las diferentes tonalidades constitutivas de la piel estarán dadas, entonces, por la concentración de melanina de un tipo u otro, más que por un problema cuantitativo.

Por otra parte, mediante experimentos efectuados en la década del 60, se demostró que la inyección de las hormonas polipeptídicas melanotrofinas alfa y beta (o melanocito-estimulantes - MSH) inducía un incremento de la pigmentación, secundario a un aumento de la melanogénesis en el interior de los melanocitos epidérmicos y del transporte de los melanosomas derivados de los melanocitos hacia el interior de los queratinocitos. Este fenómeno se observa también cuando se administra la hormona hipofisiaria adrenocórtico-tropa (ACTH), ya que comparte o presenta una gran homología en su secuencia polipeptídica con la MSH.

25

Actualmente, se acepta que la glándula hipófisis del ser humano adulto produce cantidades significativas de las hormonas ACTH y beta-lipotrofina, que son capaces de ejercer actividad melanotrófica. Estas hormonas no afectarían la pigmentación melánica en los seres humanos normales. De

30

hecho, tanto dichas hormonas como las hormonas sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona),

desempeñarían un papel muy limitado en el mantenimiento del color constitutivo de la piel del ser humano adulto. No obstante, en la hipófisis del feto humano se produce MSH, que tendría influencias sobre el sistema melanocítico en desarrollo.

Por otro lado, el mejor ejemplo del rol que cumplirían las hormonas endógenas en el oscurecimiento del color constitutivo de la piel inducido por las radiaciones ultravioletas, podría ser el melasma. Este se caracteriza por un aumento de la melanización sectorial, irregular y habitualmente simétrico, principalmente en las áreas de las mejillas, la frente y a veces el labio superior y el cuello.

El melasma es frecuente durante el embarazo normal y por lo general suele desaparecer gradualmente poco tiempo después de la finalización del mismo. Probablemente, los progestágenos y los estrógenos podrían preparar el terreno para que se produzca esa hiperpigmentación, siendo el factor desencadenante y promotor de la expresión de este fenómeno, la exposición a la luz solar. Así, por ejemplo, una pigmentación similar al melasma puede observarse en las mujeres que utilizan anticonceptivos orales. Además, estudios experimentales demostraron que la administración de hormonas conjuntamente con la radiaciones UV inducen una hiperpigmentación cutánea más intensa que cuando cualquiera de estos agentes es utilizado por separado. En estos estudios se demostró también, que en células en cultivo, la luz UV

determina un aumento de la actividad de los receptores a MSH, lo que sugiere que el bronceado de la piel normal podría ser incrementado por las melanotrofinas. Este hecho se encontraría sustentado por la menor coloración de bronceado que obtienen las personas que padecen de hipopituitarismo cuando se exponen a la radiación UV.

Aún en ausencia de estimulación UV, las hormonas producidas durante el embarazo y en ciertos trastornos hormonales, son capaces de aumentar la pigmentación melánica humana. Por ejemplo, en la enfermedad de Addison (hipocorticismismo suprarrenal), la elevada producción de ACTH no regulada por la ausencia de corticoides, promueve una hiperpigmentación generalizada. Asimismo, en el embarazo se incrementa la pigmentación de zonas no expuestas, como por ejemplo los labios mayores, laaréola y el pezón, y la línea media abdominal.

La distribución de melanocitos no es uniforme en toda la piel. De hecho, existen variaciones individuales y variaciones dentro de las distintas partes del cuerpo de un mismo individuo. Por ejemplo, en los seres humanos de todas las razas, existen más de 2.000 melanocitos por mm. cuadrado en la piel de la cabeza y antebrazos y por lo general cerca de 1.000 en el resto del cuerpo. En consecuencia, las diferencias raciales de la pigmentación cutánea no se deben a diferencias en la cantidad de melanocitos, sino a diferencias en la síntesis de melanina y melanosomas.

Los motivos de estas diferencias regionales en un mismo individuo se desconocen, pero constitutivamente están desde el nacimiento e incluso durante la vida fetal. No existe una clara correlación entre la exposición habitual a la luz solar y los melanocitos funcionales. Sin embargo, aunque hay una cantidad mayor de melanocitos en las áreas expuestas que en las áreas no expuestas del antebrazo, también se observa un aumento en la cantidad de melanocitos funcionales en la piel no expuesta después de la irradiación UV, de manera similar al aumento observado en la piel expuesta a luz UV. A ciencia cierta, no se conoce totalmente si el aumento del número de melanocitos funcionales se debe a la entrada en mitosis de estas células o bien a un reclutamiento de células quiescentes que se vuelven funcionales.

15

Evidentemente, la división de los melanocitos es importante para amplificar la producción de melanocitos funcionales en la piel irradiada con luz UV. El hecho de que los melanocitos también se dividan en la piel no irradiada indica que se requiere un recambio de la población (aunque lento), que podría relacionarse con la necesidad de eliminar las lesiones genéticas inducidas por agentes químicos y físicos intrínsecos y extrínsecos.

25

Durante la vida de una persona, se producen cambios aparentes en la coloración de la piel. Por ejemplo, casi todos los niños negros son más claros al nacer que una semana después. Las pecas, al principio sólo aparentes luego de una exposición al sol, se vuelven fijas en la adolescencia. La

piel del dorso de las manos adquiere un aspecto moteado en los sujetos de edad avanzada.

Estos cambios cuantitativos de la población de melanocitos epidérmicos relacionados con la edad del individuo o la exposición habitual a la luz del sol fueron estudiados ampliamente. En los humanos adultos se observa una declinación progresiva y dependiente de la edad de la cantidad de melanocitos, que es de una magnitud del 8 al 10% por década de vida. Estos valores rigen para las áreas no expuestas, pues en las expuestas, la reducción es mucho menor, debido probablemente al efecto estimulante de la luz UV en la población melanocítica.

En un estudio efectuado correlacionando la edad con la exposición crónica al sol, se determinó que la densidad numérica de melanocitos en todos los sujetos estudiados era de aproximadamente el doble en las áreas expuestas que en las áreas no expuestas, pero en ambos casos un descenso de la densidad con relación a la edad fue detectado. Los melanocitos de las áreas expuestas eran más activos en lo que a producción de melanina se refiere, lo que explica el mayor grado de pigmentación en las áreas visibles. La exposición crónica al sol no impide una declinación de la cantidad de melanocitos relacionada con la edad, pero afecta la producción de melanina, e induce la activación o la proliferación de los melanocitos. Es interesante destacar que los queratinocitos producen sustancias mitógenas para los melanocitos, y que esta producción se incrementa 6 veces si los queratinocitos son expuestos a la luz UV.

En los procesos de cicatrización, se pierde la unidad productora de melanina, por lo que la piel de una cicatriz es más clara que el tejido circundante. Con el correr del tiempo, puede recuperarse la coloración, dependiendo de la edad del individuo, de la exposición solar y de otros factores como por caso los hormonales. Paradójicamente, existe una contrapartida de hiperpigmentación de cicatrices, lo que habla a las claras de la compleja interacción de los diferentes elementos que intervienen en el proceso de pigmentación.

En síntesis, podemos decir que la dinámica de la pigmentación cutánea constitutiva es dependiente de factores genéticos y étnicos, y de una correcta interacción entre queratinocitos y melanocitos, influidos por un estado hormonal basal, también constitutivo.

En cambio, la coloración facultativa de la piel depende en gran medida, de otros factores externos, como es la luz solar. Ésta actúa promoviendo la proliferación de melanocitos, la activación de estos últimos y la producción de melanina, pero para su actuación deben darse fenómenos de interacción celular y hormonal determinados. A su vez, el envejecimiento tiende a disminuir la normal homeostasia de la unidad melánica de la piel, provocando desbalances en el proceso de pigmentación y mantenimiento de ésta.

El color castaño o negro que se observa en las células pigmentadas se debe a la presencia de melanina. No obstante,



este no es el único pigmento que produce estos colores ni tampoco la melanina es homogénea en su constitución química, por lo que es difícil definir qué es el pigmento melánico. No obstante, el pigmento melánico de los mamíferos ha sido  
5 dividido en dos tipos principales de melanina: la eumelanina y la feomelanina. La primera, de color castaño o negro, es insoluble y nitrogenada y deriva de la tirosina. La feomelanina, en cambio, de color amarillo o rojo, es soluble en álcalis, contiene azufre y también deriva de la tirosina,  
10 pero a través de un shunt enzimático provocado por la presencia de aminoácidos azufrados como la cisteína. En un mismo individuo coexisten ambos tipos de melanina, aunque la que predomina es la eumelanina.

15 La eumelanina de los mamíferos está compuesta básicamente por unidades de indol-5,6-quinona. Ésta deriva de la tirosina por eliminación de cinco átomos de oxígeno y la evolución de una molécula de dióxido de carbono del grupo carboxílico de la tirosina, transformándose en dopaquinona. Los indoles derivan  
20 de la ciclización de la dopaquinona, y se considera que la melanina representa principalmente una poli-indol-quinona.

Las proporciones precisas de subunidades indólicas en la melanina probablemente se encuentren bajo control enzimático,  
25 pero dependen de condiciones precisas de polimerización. La eumelanina estaría representada por una molécula con cadena rígida y con forma de bastón, conformada por unidades de indol-quinona. La estructura física de los melanosomas estaría representada por un copolímero en que la melanina y  
30 las proteínas estructurales del melanosoma transcurren

paralelas entre sí, pero pueden unirse en los sitios de grupos planares. Luego en el melanosoma elíptico, la melanina se dispondría en forma de doble hélice, polimerizada con proteínas.

5

Por el contrario, desde un punto de vista químico, la feomelanina se diferencia por la elevada cantidad de azufre que es resultante del agregado nucleofílico del aminoácido cisteína a la dopaquinona formada por la acción de la  
10 tirosinasa. La cisteína interactuaría principalmente a través de una adición 1:6 a la dopaquinona formada enzimáticamente, para dar lugar al compuesto 5-S-cisteinildopa. También se identificaron compuestos intermedios similares, dependiendo de la fuente de azufre de la feomelanina. A diferencia de la  
15 dopa, la cisteinil dopa no es sustrato de la tirosinasa.

Finalmente, es probable que la mayor parte de la melanina sea de tipo mixto, dependiendo de la cantidad de eumelanina sintetizada y de intermediarios de la feomelanina. Estos  
20 compuestos copolimerizan para formar una melanina mixta, lo que explicaría las diferentes tonalidades ópticas obtenidas con las melaninas.

En los mamíferos, la tirosinasa es una enzima que cumple dos  
25 funciones: convierte la tirosina en dopa y luego la dopa en dopaquinona, la que después es ciclizada y nuevamente oxidada para dar lugar a la formación de eumelanina. En cambio, si la dopaquinona se une a la cisteína se formará la feomelanina.

La tirosinasa existe bajo la forma de tres isómeros, aunque puede considerarse como una monoxigenasa que contiene cobre y cataliza la hidroxilación del monofenol y la oxidación del difenol, es decir, la dopa (dihidroxifenilalanina), para  
5 formar una quinona. Las dos actividades enzimáticas se denominan generalmente actividad creolasa o monofenolasa y actividad catecolasa o difenolasa.

Existen varios factores que modifican el producto de la  
10 tirosinasa, entre ellos el factor de conversión del dopacromo, que acelera la conversión del dopacromo en 5,6-dihidroxiindol, el factor bloqueante del indol que inhibe la conversión del 5,6 dihidroxiquinol en melanocromo y el factor de conversión del indol, que acelera la conversión del 5,6-  
15 dihidroquinol en melanocromo. En particular, el factor bloqueante del indol y el factor de conversión del dopacromo están íntimamente asociados a las formas isoméricas solubles de la tirosinasa (tipos I y II, las de menor concentración dentro del melanosoma), mientras que el factor de conversión  
20 del dopacromo está asociado al isómero fijado de tirosinasa (tipo IV). Estos factores son sistemas enzimáticos auxiliares entre los que se destaca la dopacromo-oxidoreductasa (dopacromo-isomerasa o dopacromo tautomerasa). Su función es la de formar tautómeros del dopacromo para formar derivados  
25 carboxílicos. Sin estos factores, la melanina no termina de madurar para polimerizarse.

Además de la dopacromo tautomerasa existen otras enzimas (peroxidasa, catalasa y enzimas metabólicas de la glutamina)

e iones metálicos que actúan en la regulación de la melanogénesis a nivel post-tirosinasa.

En síntesis, la melanogénesis depende de una perfecta  
5 interacción funcional entre la enzima tirosinasa y su  
sustrato la tirosina, para luego dar lugar a dopa y  
posteriormente dopaquinona. Esta última es tomada por  
factores enzimáticos post-tirosinasa para producir su  
reconversión en unidades indólicas que terminarán  
10 polimerizándose, para dar lugar a un co-polímero con  
proteínas estructurales del melanosoma, produciendo la  
eumelanina. La presencia de cisteína en la matriz del  
melanosoma bloquea la acción de estos factores post-  
tirosinasa, dando lugar a otros compuestos intermedios,  
15 solubles, con incapacidad para polimerizarse. Sin embargo, es  
común encontrar una mezcla de melaninas parcialmente  
polimerizadas, dependiendo de la concentración de azufre que  
contienen. Esto explica las diferentes tonalidades  
encontradas entre las diferentes melaninas, ya que su  
20 estructura variada absorberá ciertas longitudes de onda del  
espectro lumínico visible, de manera diferente según el tipo  
de melanina en juego.

Esto no debe confundirse con el color de la piel, ya que  
25 sólo es aplicable al color del pigmento. En la conformación  
del color cutáneo intervienen otros factores, tales como la  
concentración de diferentes tipos de melanina, la dispersión  
de éstos en la unidad melánica, los tipos de melanosomas  
creados y la difracción que provoca la epidermis que actúa  
30 como pantalla difuminante. También intervienen en la

conformación del color cutáneo, la presencia de otros pigmentos en la piel, básicamente los hemoglobínicos, que en pieles claras se visualizan adecuadamente, pero en pieles oscuras, quedan enmascarados por el pigmento melánico  
5 aposicionado en la epidermis.

Frecuentemente, ocurre en un individuo dado que un área de la piel, en la que la densidad de la melanina dentro de los melanocitos está marcadamente aumentada, posee un color  
10 cutáneo del área afectada más oscuro que el color de la piel circundante. Estas áreas son conocidas como áreas de hiperpigmentación y pueden causar malestar al individuo.

Entre las causas más frecuentes de hiperpigmentación se citan  
15 la respuesta exagerada de un sector de piel a la estimulación ultravioleta, la hipersensibilidad a la luz ultravioleta provista por agentes exacerbantes de la acción de la radiación (como por ejemplo, cosméticos con aceite de bergamota o agentes denominados genéricamente fototóxicos),  
20 disturbios hormonales (como por ejemplo, alteraciones de las hormonas tiroideas, de esteroides sexuales, endógenos y exógenos y el embarazo) y la hiperpigmentación secundaria o consecuente con una lesión inflamatoria. En particular, la hiperpigmentación post-inflamatoria presenta manchas  
25 irregulares, más pigmentadas que la piel circundante, que ocurre luego de una inflamación debida a una injuria de la piel a partir de un insulto como el acné, la foliculitis, el eccema, la depilación, el rascado, etc. Dicha hiperpigmentación post-inflamatoria se resuelve lentamente,  
30 pero puede persistir por meses y aún años, y es motivo

frecuente de consulta médica, requiriendo la mayor parte de las veces atención profesional.

Hasta la fecha, se han descrito diversas composiciones  
5 tópicas cutáneas conteniendo uno o más ingredientes capaces de reducir la densidad de melanina en los melanocitos cutáneos. Tales ingredientes son denominados genéricamente como agentes depigmentantes o agentes blanqueadores. Dichos agentes son por lo general absorbidos hacia las capas más  
10 inferiores de la piel, inhibiendo la formación de melanina en los melanocitos y actuando específicamente sobre etapas determinadas de la melanogénesis. Los agentes depigmentantes mas frecuentes están basados en la hidroquinona o derivados de ésta, como el bencil-oxi-fenol y el monobencileter de  
15 hidroquinona (US Pat. 3.060.097). Este último compuesto presenta la desventaja que no es metabolizado adecuadamente cuando se absorbe por la piel, por lo que se lo asocia con incidentes de depigmentación irreversible que simulan un vitiligo (áreas de depigmentación cutánea, a menudo con un  
20 borde hiperpigmentado, que se van extendiendo gradualmente). Asimismo, el bencil-oxi-fenol presenta el inconveniente que es transportado por el sistema linfático hacia otras áreas de la piel, alejadas del sitio de aplicación, donde puede también llegar a ejercer un efecto aclarante.

25

También ha sido propuesto como agente de depigmentación cutánea al compuesto metoxifenol, un éter de la hidroquinona, el que ha sido utilizado en composiciones farmacéuticas depigmentantes, pero que presenta el inconveniente que, por  
30 ser relativamente insoluble en medios acuosos, resulta



difícil de ser incorporado adecuadamente en formulaciones cosméticas o dermatológicas.

- Otros compuestos utilizados para depigmentar la piel son el
- 5 4-isopropil catecol, un derivado sustituido de la hidroquinona (Solicitud de Pat. Sudafricana 716,890) y los mono y di-ésteres de ácidos grasos de hidroquinona (Solicitud de patente europea Nro. 82301102.8)
- 10 También se ha propuesto la utilización directa de la hidroquinona en cosméticos para el tratamiento de la hiperpigmentación, ya que ésta es efectiva, soluble en agua y rápidamente metabolizada y excretada. No obstante, la hidroquinona presenta el inconveniente que es inestable en
- 15 medio alcalino y que es oxidada a la forma quinona, lo cual imparte un color amarronado a cualquier composición farmacéutica que la contenga. Para prevenir esta oxidación es necesario incorporar un antioxidante a la composición, tal como ácido ascórbico. De hecho, se ha propuesto por ejemplo,
- 20 la estabilización de la molécula de hidroquinona al incorporarla a un medio anhidro. Así, en la patente US 4,466,955 se describe una preparación cosmética en la cual la hidroquinona se disuelve en ésteres grasos y la solución resultante es incorporada a una base cremosa cosmética no
- 25 acuosa en la cual la hidroquinona es más estable y menos propensa a la oxidación. Ello se debe a que el oxígeno es menos soluble en ceras que en agua y por lo tanto, el proceso de oxidación ocurre en menor medida. Además, de acuerdo a lo revelado, esta preparación favorece la absorción cutánea de
- 30 hidroquinona.

La hidroquinona es la denominación genérica que recibe el compuesto 1,4 bencenediol o p-dihidroxibenceno, el cual posee un peso molecular de 110.0. Su mecanismo de acción está dado por la inhibición de la oxidación enzimática de la tirosina a 3,4-dihidroxifenil-alanina (DOPA) y por la supresión de otros procesos metabólicos del melanocito.

La desventaja principal de la hidroquinona es que es también un irritante cutáneo, pudiendo causar una hiperpigmentación paradójica, denominada ocronosis. Asimismo, se ha descrito recientemente el poder carcinogénico de la hidroquinona, al describirse al menos 5 casos de melanomas cutáneos en un grupo de trabajadores con contacto cotidiano con esta sustancia.

La idebenona, por otra parte, es una benzoquinona cuyas propiedades farmacodinámicas han sido establecidas dentro de las drogas con efectos cito protectores, tal como se describe por ejemplo en la patente US 4,271,083. Idebenona es el nombre genérico que recibe el compuesto 6-(10-hidroxidecil)-2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona (JP-B-62 3134 (1987), U.S. Pat. No. 4,139,545). Datos obtenidos a partir de ensayos *in vitro* sugieren que la acción cito protectora de la idebenona es alcanzada al facilitar la convergencia de electrones en el ciclo respiratorio mitocondrial, inhibiendo la peroxidación lipídica, reduciendo el consumo de oxígeno no respiratorio y estimulando la formación de ATP.

La idebenona es considerada una Coenzima Q10 sintética y se la utiliza, administrada por boca, para mejorar desórdenes cognitivos, enfermedad de Alzheimer, demencias y trastornos vasculares cerebrales, y como citoprotector cardíaco. Debido a sus propiedades antioxidantes, se la administra por vía oral, ya sea sola, como también en combinación con otras sustancias activas, preferentemente que posean también propiedades anti-oxidantes, como por ejemplo la vitamina E.

- 10 Los documentos de patentes DE 3.049.039, EP 0,788,793, US 4.436.753, US 5.059.627 y US 5.916.925 describen preparaciones orales, parenterales o percutáneas que comprenden idebenona o sus derivados, utilizables en el tratamiento de la demencia, de los disturbios de la
- 15 circulación sanguínea o para la inducción de factores de crecimiento neurales. En particular, la patente JP 1.279.818 describe el uso de la idebenona y sus derivados en diversas preparaciones utilizables para dar color exógeno al pelo (la idebenona es un polvo que posee un color anaranjado fuerte).
- 20 Hasta la fecha, no se han descripto efectos tóxicos importantes para la idebenona (Arzneim. Forsch/drug res. 35 (II), 11, pp. 1704, 1985).

De manera sorprendente, hemos encontrado ahora que una

25 preparación para uso tópico cutáneo que comprende idebenona puede producir una disminución importante de la concentración de pigmento en áreas pigmentadas sin producir efectos secundarios importantes.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO**

La presente invención se refiere al uso de la idebenona en una composición destinada a ser aplicada sobre la piel, con el objeto de inhibir la melanogénesis.

Asimismo, la presente invención se refiere a una composición destinada a la aplicación tópica sobre la piel, que comprende una cantidad cosmética, farmacéutica y/o dermatológicamente efectiva de idebenona, sus derivados o mezclas de los mismos.

En particular, la presente invención se refiere a una preparación cosmética capaz de conferir un efecto beneficioso en los procesos de hiperpigmentación cutánea. De preferencia, la presente invención se refiere a preparaciones cosméticas o dermatológicas que comprenden idebenona y/o sus derivados, y que disminuyen el aumento local de la coloración de la piel causada por un incremento en la producción de melaninas.

La presente invención también se refiere al uso de la idebenona en una composición cosmética destinada a ser aplicada sobre la piel con el objeto de producir despigmentación de la piel en el sitio de aplicación. En el presente documento, el termino "despigmentación" debería entenderse como la obtención de una decoloración en una zona pigmentada de la piel hasta lograr una coloración similar a la de la piel circundante. En particular, la zona pigmentada puede deberse a algún desorden de la piel y más particularmente a desórdenes de la piel seleccionados entre psoriasis, rosácea, piel dañada por la radiación

ultravioleta, dermatitis atópica, hiperpigmentación post-medicamentosa, hiperpigmentación post-inflamatoria, cloasma del embarazo y dermatitis seborreica. Asimismo, en el presente documento, la frase "disminuir la coloración de la piel", debería entenderse como disminuir el tono de la piel hasta lograr una disminución en la escala colorimétrica observable a ojo desnudo.

La composición destinada a la aplicación tópica sobre la piel de la invención, puede encontrarse por ejemplo, en forma de crema, de gel, de parche oclusivo, de emulsión o de aerosol. De preferencia, la composición de la invención se encuentre en forma de crema (O/W). Asimismo, de acuerdo con la invención, la idebenona podría estar comprendida en una composición tópica de liberación controlada, en particular, donde la idebenona se encuentre liposomada o formando complejos. La formulación de este tipo de composiciones se encuentra dentro del estado de la técnica.

De preferencia, la composición destinada a ser aplicada sobre la piel de la invención comprende idebenona o un derivado de la misma en una cantidad comprendida entre 0.1% y 10% p/p. Más preferentemente aún, la idebenona o su derivado se encuentra en una cantidad comprendida entre 0.3% y 5% p/p.

25

Ejemplos de compuestos derivados de la idebenona, pueden ser entre otros, aquellos revelados en los documentos de patentes US 4,139,545, US 4,436,753, DE 3.049.039, EP 0,788,793, US 4,436.753, US 5.059.627 y US 5.916.925.

30

La composición de la invención podría ser formulada por el experto en el arte, utilizando excipientes conocidos cosmética o farmacéuticamente aceptables. De preferencia, la composición comprenderá componentes oleosos y componentes  
5 hidrosolubles. Ejemplos de componentes oleosos pueden ser cera autoemulsionable, vaselina, miristato de isopropilo y alcohol cetílico. Ejemplos de componentes hidrosolubles pueden ser glicerina, metilparabeno y propilparabeno. Asimismo, la composición de la invención podría contener  
10 además agentes beneficiosos para la piel como por ejemplo humectantes, hidratantes y vitaminas, los cuales son conocidos y pueden ser elegidos por el experto en la técnica. De ser necesario, la composición de la invención puede comprender además antioxidantes cosmética y/o  
15 farmacéuticamente aceptables, filtros y/o pantallas solares.

La presente invención se refiere además a un método para el tratamiento de la pigmentación de la piel no deseada que comprende colocar en el sitio pigmentado una composición que  
20 comprenda una dosis despigmentante efectiva de idebenona, dejar actuar durante toda la noche y enjuagar por la mañana.



EJEMPLOS

Ejemplo N°1

- 5    i) Formulaciones de crema acuosa (O/W) conteniendo idebenona (IDB)

Tabla I:

INGREDIENTES	% EN PESO					
Agua	C.s.p 100 g de crema					
Cera autoemulsionable iónica	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
Vaselina	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Glicerina	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Miristato de Isopropilo	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Alcohol Cetílico	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Metilparabeno (Nipagin)	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Propilparabeno (Nipasol)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Idebenona	0,10	0,20	0,3	0,5	2.50	4

- 10    ii) Procedimiento de elaboración de cremas conteniendo idebenona.

Los componentes oleosos (A) de la formulación (Cera autoemulsionable, Vaselina, Miristato de Isopropilo y Alcohol Cetílico) se funden y calientan hasta una temperatura de 70/75°C. Separadamente se disuelven los componentes hidrosolubles (B) de la formulación (Glicerina, Metilparabeno, y Propilparabeno) en la cantidad de agua necesaria, según se describe más arriba, y se los calienta a 70/75°C.

Seguidamente, controlando que la temperatura de los componentes oleosos e hidrosolubles sea la misma, se agrega la fase oleosa (A) sobre la fase acuosa (B) con agitación enérgica y constante. Se enfría en baño de agua, y se agita lentamente hasta que la temperatura llegue a 45°C. Una vez alcanzada la temperatura deseada, se disuelve la cantidad requerida de Idebenona, según se describe más arriba, en 0,5 ml de etanol y se agrega a la preparación anterior con agitación lenta hasta obtener una preparación homogénea. Se deja enfriar hasta consistencia deseada y se envasa adecuadamente.

En los casos en que la concentración de Idebenona sea superior a 3%, es posible que se necesite aumentar la proporción de componentes de la fase oleosa para lograr solubilizar el principio activo. Si la concentración de Idebenona requerida es muy superior a 4%, puede sustituirse la crema base acuosa por una crema oleosa (W/O)

20

### Ejemplo N°2

Efectos de la aplicación de una composición comprendiendo idebenona aplicada sobre la piel de animales de experimentación.

25

Se prepararon cremas conteniendo 5% y 2.5% p/p de idebenona (IDV) en una fase neutra. Dichas cremas y una crema de idéntica formulación pero sin idebenona se aplicaron a ratones nude adultos de 3 meses de edad. La crema con IDB

30

fue aplicada sobre la mitad derecha del cuerpo de los animales y la crema control sobre la mitad izquierda de acuerdo al esquema que se detalla a continuación. Los animales fueron sacrificados luego de 1, 2, 3 o 4 horas luego de la aplicación de la crema (p.a).

Lote A: animal tratado con IDB 5% (1 hora p.a.)

Lote B: animal tratado con IDB 2,5% (1 hora p.a.)

Lote C: animal tratado con IDB 5% (2 horas p.a.)

10 Lote D: animal con IDB 2,5% (2 horas p.a.)

Lote E: animal con IDB 5% (3 horas p.a.)

Lote F: animal con IDB 2,5% (3 horas p.a.)

Lote G: animal con IDB 5% (4 horas p.a.)

Lote H: animal con IDB 2,5% (4 horas p.a.)

15

Las áreas de piel tratada y control fueron removidas y fueron divididas en 3 sectores: uno para dosar idebenona mediante cromatografía gaseosa, otro para determinación de retención de humedad y el tercero para inclusión en parafina.

20

*Dosaje de idebenona por Cromatografía Gaseosa:* Los sectores de piel tratados y controles fueron colocados con la epidermis hacia abajo sobre una platina de criostato y se obtuvieron cortes paralelos a la superficie, de 300 micrones de espesor, de manera tal de obtener un corte profundo, un corte superficial y un corte medio. Cada corte fue identificado, homogeneizado y resuspendido en acetona. Cada extracto fue analizado por Cromatografía Gaseosa utilizando un cromatógrafo gaseoso modelo *Hewlett Packard 5890*,  
25  
30 utilizando una columna capilar con metil silicona como fase

- estacionaria (HP-IMS, .25m x 0,2 mm, 0,33 $\mu$  de espesor de film). El programa de temperaturas consistió en una temperatura inicial de 100 grados centígrados durante 3 minutos, para luego continuar con un calentamiento con incrementos de temperatura de 20 grados centígrados por minuto hasta alcanzar los 300°C. Esta última temperatura se mantuvo durante 5 minutos. Un flujo de Helio de 0.7ml/min fue utilizado. El cromatógrafo se encontraba provisto de un detector de masas cuadrupolar acoplado (modelo HP 5972) y se utilizó ionización por impacto electrónico a 70 eV, en modo SCAN, con un barrido de masas de 50 a 600 m/z. 2  $\mu$ l de muestra se inyectaron en modo split 1/25, con una temperatura de inyector de 250°C y una temperatura de interfase de 280°C.
- 15 *Determinación de humedad:* Cada sector de piel tratado y control fue pesado en una balanza analítica y luego colocado en un horno a 120°C durante 30 minutos. Luego las muestras fueron enfriadas durante 30 minutos a temperatura ambiente para ser pesadas nuevamente. El porcentaje de humedad se
- 20 calculó según la siguiente fórmula:

PESO PREEVAPORACION - PESO POSTEVAPORACION

PESO PREVIO

25

De esta manera, se calculó el incremento de agua de la piel tratada en relación con la piel control dividiendo el porcentaje obtenido en cada sector tratado por el porcentaje obtenido en el control respectivo.

30

*Estudios morfológicos y morfométricos:* Se midió el espesor de la epidermis, de la capa córnea, de la dermis papilar y de la dermis reticular en al menos 10 puntos diferentes, expresándose el resultado como el promedio de las 10 mediciones. Asimismo, los diámetros de los vasos capilares fueron medidos en al menos 10 puntos, expresándolos mediante su promedio. Las mediciones fueron efectuadas utilizando un equipo procesador de imágenes *Quantimet 500+* (*Leica*). Se realizaron coloraciones especiales para componentes del tejido conectivo y coloraciones de Giemsa, azul de metileno, azul de toluidina (para observar metacromasia y distribución de agua en intersticio) y Schorr (este último para observar comportamiento de queratinas).

*Estudios inmunohistoquímicos:* en cortes alternos del material incluido en parafina, se determinó la sobreexpresión de proteínas de choque (*heat shock proteins - HSPs*) mediante técnicas de inmunomarcación enzimática, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra HSP27 (*Dako Labs*) y revelado con un APAAP kit (*Dako Labs*).

*Morfología:* Las pieles de los animales tratados con crema con IDB al 5% y al 2,5% no mostraron alteraciones morfológicas, siendo similares las imágenes microscópicas a las pieles control. Las técnicas de tinción especial no mostraron diferencias entre las distintas muestras examinadas, aún en los distintos tiempos de tratamiento. Tampoco hubo modificaciones en las coloraciones con tinción de Schorr para la observación de diferentes calidades de queratinas.

*Morfometría epidérmica:* Los resultados se resumen en la tabla II. Se puede apreciar que no se detectaron diferencias significativas en el espesor de la epidermis ni de la capa córnea entre las pieles tratadas y las pieles control.

5 Tampoco se detectaron diferencias significativas entre las dos concentraciones de IDB ensayadas ni entre los distintos tiempos de aplicación de las cremas. Por consiguiente, puede concluirse entonces que la idebenona aplicada en forma tópica no modifica sustancialmente los espesores epidérmicos,

10 mostrando así inocuidad local.

*Tabla II: Espesor de epidermis total y de capa córnea en piel de ratón tratada con cremas conteniendo 5 y 2,5% de idebenona y su comparación con piel tratada con una crema neutra sin idebenona*

15 *como control. Los valores están expresados en micrones, como promedio de diez mediciones efectuadas (cifras redondeadas a dos decimales). En el caso de los controles, los valores están expresados como el promedio de las mediciones totales, es decir, de dos animales por punto, ya que se utilizaron dos controles, uno*

20 *para la crema conteniendo IDB 5% y otro para la crema conteniendo IDB 2,5%.*

		1 hora	2 horas	3 horas	4 horas
		p.a.	p.a.	p.a.	p.a.
IDB 5%	Epidermis total	60,37	58,44	60,04	59,73
	Capa córnea	32,40	32,23	33,25	32,09
IDB 2,5%	Epidermis total	59,73	60,21	58,48	57,47
	Capa córnea	33,28	32,79	31,02	32,43



Control	Epidermis total	58,92	59,65	57,87	60,11
	Capa córnea	30,96	31,37	32,03	31,55

Morfometría dérmica: Los espesores de la dermis papilar y de la dermis reticular no variaron de manera significativa entre los distintos animales examinados. Por consiguiente, puede concluirse entonces que la idebenona aplicada en forma tópica no modifica sustancialmente los espesores epidérmicos, mostrando así inocuidad local.

10 *Diámetros vasculares:* Los resultados se resumen en la tabla III. Se puede apreciar que no existen diferencias significativas entre los diámetros vasculares de la microcirculación entre las pieles tratadas con IDB y las pieles control, como tampoco entre las dos concentraciones de IDB ensayadas ni entre los distintos tiempos de aplicación de las cremas. Por consiguiente, puede concluirse entonces que la idebenona aplicada en forma tópica no modifica sustancialmente los diámetros vasculares de la microcirculación, demostrándose así la falta de modificaciones hemodinámicas locales.

25 *Tabla III: Diámetros de vasos capilares dérmicos de pieles tratadas con una crema conteniendo IDB al 5%, una crema conteniendo IDB al 2,5% y crema base (sin IDB). Los diámetros están expresados en micrones como promedio de diez mediciones efectuadas (cifras redondeadas a dos decimales). En el caso de los controles, los valores están expresados como el promedio de las mediciones totales, es decir, de dos animales por punto, ya que se*

utilizaron dos controles, uno para la crema conteniendo IDB 5% y otro para la crema conteniendo IDB 2,5%.

	1 hora p.a.	2 horas p.a.	3 horas p.a.	4 horas p.a.
IDB 5%	6,70	8,77	5,88	7,03
IDB 2,5%	6,55	7,03	6,32	6,76
Control	7,00	7,09	6,84	6,91

5 *Sobreexpresión de HSPs:* No se detectaron diferencias en la  
 expresión de HSPs entre las epidermis tratadas con la crema  
 control (sin IDB) y las epidermis tratadas con las cremas  
 conteniendo IDB. Tampoco se encontraron diferencias entre las  
 10 pieles tratadas a distintos tiempos post-aplicación con las  
 cremas conteniendo IDB al 5% y al 2,5%. Por consiguiente,  
 puede concluirse entonces que el tratamiento con IDB en las  
 concentraciones estudiadas no produce incrementos de la  
 expresión de HSPs epidérmicas en la piel de ratones, por lo  
 que puede inferirse que no existe injuria epidérmica que  
 justifique la sobre expresión de este sistema de defensa  
 15 celular contra la agresión.

20 *Determinación de humedad:* Los pesos de las pieles tratadas y  
 controles, antes y después del tratamiento evaporante,  
 arrojaron un porcentaje de humedad similar entre los grupos  
 tratados con diferentes concentraciones de IDB y los  
 controles. Tampoco se detectaron diferencias significativas  
 entre los distintos tiempos post-aplicación. Los resultados  
 se resumen en la tabla IV.

5 *Tabla IV: Porcentajes de humedad y capacidad de retención de agua en la piel tratada con respecto a los controles. Los valores están expresados en gramos como el promedio de las determinaciones efectuadas a 1, 2 3 y 4 horas luego de la aplicación de las cremas.*

	Peso previo	Peso post	Diferencia	Porcentaje	Retención
IDB 5%	1,3231	1,0391	0,2840	21,46%	0,89 veces
IDB 2,5%	0,9904	0,7616	0,2288	23,10%	0,96 veces
Control	1,0924	0,8300	0,2624	24,02%	

10 Por consiguiente, puede concluirse entonces que el tratamiento con IDB en las concentraciones estudiadas no modifica la cantidad de agua en los tejidos (la diferencia de retención de agua entre las pieles tratadas con IDB y las pieles tratadas con crema sin IDB no es estadísticamente significativa).

15

Penetración de IDB en piel: A las 2 horas de aplicada, se obtuvo un pico de IDB a un tiempo de retención de 17,6 minutos en el corte más superficial (este corte incluye la totalidad de la epidermis y la porción superior de la dermis), tanto en la muestra tratada con IDB al 5% como con la muestra tratada con IDB al 2,5%. Por el contrario, las muestras correspondientes a sectores profundos y medios (dermis reticular e hipodermis) no mostraron este pico. Por otra parte, 1 hora después de la aplicación, ninguna de las muestras mostraron este pico (ni las tratadas con IDB, ni las muestras control). Por consiguiente, puede concluirse

20

25

entonces que la IDB penetra en la piel y que es retenida luego de dos horas de su aplicación, en los sectores más superficiales de la misma.

5 Ejemplo N°3

Efectos de la aplicación de composiciones que comprenden diferentes concentraciones de idebenona sobre la piel de seres humanos.

10

Para estos experimentos se utilizaron muestras de piel de pacientes identificadas como Pacientes 1, 2 y 3, a las cuales se le realizaron los siguientes procedimientos:

15 Pacientes 1 y 2:

Se utilizó la piel mamaria de dos pacientes (ambas mujeres de 74 y 71 años de edad respectivamente) que serían sometidas a una mastectomía radical y a una mastectomía simple debido a la presencia de un carcinoma mamario y una displasia florida.

20

Aproximadamente 45 minutos antes del ingreso al quirófano, se dividió la superficie mamaria en tres territorios de superficie similar y se agregó en el primero de ellos aproximadamente 120 mg de crema conteniendo IDB 5%, mediante un masaje circular suave, hasta la absorción total de la crema. Los dos sectores restantes fueron tratados de manera similar, utilizando en cada uno de ellos crema conteniendo aproximadamente 120 mg de crema conteniendo IDB 2.5% y crema control. Ya en quirófano, y previamente a la preparación del

30

campo operatorio, la superficie mamaria fue lavada con etanol 95° para remover el eventual excedente de crema.

5 Inmediatamente luego de la operación (tiempo promedio de actividad quirúrgica: 45 minutos), se resecó aproximadamente 4 cm<sup>2</sup> de un sector de piel de cada área, identificándoselo correctamente. Una vez resecado el sector, se removi6 cuidadosamente el tejido adiposo subcutáneo, de manera tal de obtener únicamente epidermis y dermis.

10

Paciente 3:

Se utilizó la piel mamaria de una paciente (femenino, 54 años de edad) que sería sometida a una mastectomía radical debido  
15 a la presencia de un carcinoma mamario.

Aproximadamente 45 minutos antes del ingreso al quirófano, se dividió la superficie mamaria en tres territorios de superficie similar y se agregó en el primero de ellos  
20 aproximadamente 120 mg de crema conteniendo IDB 5%, mediante un masaje circular suave, hasta la absorción total de la crema. Los dos sectores restantes fueron tratados de manera similar, utilizando en cada uno de ellos crema conteniendo aproximadamente 120 mg de crema conteniendo IDB 0.5% y crema  
25 control. Ya en quirófano, y previamente a la preparación del campo operatorio, la superficie mamaria fue lavada con etanol 95° para remover el eventual excedente de crema.

Inmediatamente luego de la operación (tiempo promedio de  
30 actividad quirúrgica: 90 minutos), se resecó aproximadamente



4 cm<sup>2</sup> de un sector de piel de cada área, identificándoselo correctamente. Una vez resecado el sector, se removi6 cuidadosamente el tejido adiposo subcutáneo, de manera tal de obtener únicamente epidermis y dermis.

5

Sobre las muestras de piel de las Pacientes 1, 2 y 3 se investigó el efecto de la aplicación de cremas conteniendo 0,5%, 2.5% y 5% de idebenona sobre la morfología y morfometría de las diferentes capas cutáneas, de los vasos sanguíneos del plexo dérmico y sobre la expresión de HSPs, como una forma de evaluar la respuesta epidérmica a un eventual efecto deletéreo de las cremas.

Los sectores de piel tratados con cremas conteniendo IDB y con crema control se fijaron en solución de formol, se incluyeron en parafina y se colorearon con técnicas de tinción histológica mediante hematoxilina y eosina, Schorr, Giemsa, y azul de toluidina.

20 *Morfometría:* Sobre los cortes histológicos se efectuaron mediciones del espesor epidérmico, de la capa córnea, de la dermis papilar, de la dermis reticular y de los diámetros capilares del plexo dérmico.

25 *Estudio inmunohistoquímico:* Cortes alternos incluidos en parafina fueron desparafinados, e incubados con un antisuero de origen comercial dirigido contra HSP27 (*Dako Labs*). La reacción fue revelado utilizando un APAAP kit (*Dako*).

Aspecto macroscópico: Las áreas de piel tratadas con cremas  
conteniendo IDB, con cremas control sin IDB y sin tratar no  
mostraron diferencias significativas cuando se las observó a  
ojo desnudo. Por consiguiente, puede concluirse entonces que  
5 el tratamiento con cremas conteniendo IDB, en las diferentes  
concentraciones ensayadas, no produjeron irritación durante  
el tiempo en que permanecieron aplicadas.

Microscopía: no se detectaron alteraciones estructurales en  
10 las pieles tratadas con las cremas control ni en las pieles  
tratadas con cremas conteniendo diferentes concentraciones  
de IDB, aún cuando se utilizaron técnicas de tinción  
especial. En particular, no se detectó acumulación de  
líquido intersticial, alteraciones vasculares ni acumulación  
15 de elementos inflamatorios en la dermis. Todas las capas  
epidérmicas estudiadas mantuvieron su integridad y  
arquitectura.

Análisis morfométrico de los espesores epidérmicos: En la  
20 siguiente tabla se resumen brevemente los resultados  
obtenidos.

Tabla V: Valores de espesores de la epidermis total y de la capa  
córnea de piel mamaria de voluntarias tratadas con cremas  
25 conteniendo IDB a distintas concentraciones y control, durante  
diferente tiempo. Los valores obtenidos están expresados en  
micrones, como resultado del promedio de 10 determinaciones  
efectuadas.

	Espesor epidérmico	Espesor capa córnea
--	--------------------	---------------------

<b>Paciente 1</b>		
IDB 5%	62,40	35,80
IDB 2,5%	61,31	32,89
Control	61,40	36,32
<b>Paciente 2</b>		
IDB 5%	72,81	28,20
IDB 2,5%	64,82	27,03
Control	72,31	31,02
<b>Paciente 3</b>		
IDB 5%	49,01	21,97
IDB 0,5%	49,06	28,90
Control	48,95	25,87

Por consiguiente, puede concluirse entonces que la aplicación sobre la piel de cremas conteniendo diferentes concentraciones de IDB no modifican significativamente los espesores epidérmicos.

Morfometría de la dermis: No se detectaron diferencias significativas en las mediciones de los espesores de dermis reticular y dermis papilar entre las distintas muestras evaluadas. Por consiguiente, puede concluirse que la aplicación de cremas conteniendo diferentes concentraciones de IDB no produce modificaciones dérmicas inmediatas.

Morfometría de vasos del plexo dérmico: No se detectaron diferencias significativas en las mediciones de diámetros

vasculares entre las distintas muestras evaluadas. Los resultados obtenidos se resumen en siguiente la tabla:

5      *Tabla VI: Diámetros vasculares de vasos del plexo dérmico de  
pieles tratadas con cremas conteniendo diferentes concentraciones  
de IDB y crema control. Los valores obtenidos están expresados en  
micrones, como resultado del promedio de 10 determinaciones  
efectuadas.*

Diámetros vasculares	
<i>Paciente 1</i>	
IDB 5%	12,42
IDB 2,5%	9,15
Control	11,42
<i>Paciente 2</i>	
IDB 5%	11,90
IDB 2,5%	12,30
Control	11,82
<i>Paciente 3</i>	
IDB 5%	7,71
IDB 0,5%	7,92
Control	7,85

De los resultados obtenidos, puede concluirse que la  
 5 aplicación de cremas conteniendo diferentes concentraciones  
 de IDB no modifica el tono vascular de la piel tratada.

*Distribución y expresión de HSP27:* No se detectaron  
 diferencias en la expresión y distribución de HSP en las  
 10 diferentes muestras tratadas con cremas conteniendo  
 diferentes concentraciones de IDB y con cremas control (sin  
 IDB) en ninguna de las pacientes evaluadas. De los resultados  
 obtenidos, puede concluirse que la aplicación de cremas  
 conteniendo diferentes concentraciones de IDB no modifica la

expresión y distribución de HSP27, siendo esta proteína un parámetro de la respuesta epidérmica a una eventual injuria.

#### Ejemplo N°4

5

Efectos de la aplicación de una composición comprendiendo idebenona aplicada sobre la piel de seres humanos:  
Determinación de humedad

- 10 Se utilizó la piel mamaria de la Paciente identificada como 3 en el ejemplo anterior.

Se fraccionó una crema base como la utilizada en el ejemplo 1 en 3 alícuotas, adicionándose a la primera una cantidad suficiente de idebenona (99.3% de pureza) como para obtener una concentración final de IDB del 5%, a la segunda una cantidad suficiente de idebenona (99.3% de pureza) como para obtener una concentración final de IDB del 0.5% y se utilizó a la tercera alícuota (sin agregado de IDB) como control.

20

*Determinación de humedad:* Cada sector de piel tratado y control fue pesado en una balanza analítica y luego colocado en un horno a 120°C durante 30 minutos. Luego las muestras fueron enfriadas durante 30 minutos a temperatura ambiente para ser pesadas nuevamente. El porcentaje de humedad se calculó según la siguiente fórmula:

25

PESO PREEVAPORACION - PESO POSTEVAPORACION

PESO PREVIO

30



De esta manera, se calculó el incremento de agua de la piel tratada en relación con la piel control dividiendo el porcentaje obtenido en cada sector tratado por el porcentaje obtenido en el control respectivo. Los resultados obtenidos se resumen brevemente en la tabla siguiente:

Tabla VII

	Peso previo	Peso post.	Diferencia	Porcentaje	Retención
IDB 5%	3,6308	2,6706	0,9602	26,45%	0,84 veces
IDB 0,5%	2,2653	1,5846	0,6807	30,04%	0,95 veces
Control	2,1288	1,4560	0,6728	31,60%	

Por lo tanto, la IDB aplicada tópicamente sobre la piel, en las concentraciones estudiadas, no incrementó la cantidad de agua contenida en la piel.

#### Ejemplo N°5

#### 15 Inhibición de la melanogénesis por idebenona.

Con el objeto de evaluar la capacidad de la idebenona para inhibir la melanogénesis, se efectuaron determinaciones *in vitro* siguiendo el método desarrollado por Dooley y colaboradores (*Skin Pharmacol*, 1994; 7:188-200), de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación:

#### *Materiales y métodos:*

25 **Células:** El estudio fue realizado utilizando una línea celular derivada de melanoma humano, provista por ABAC

(Asociación Banco Argentino de Células), con capacidad de síntesis de melanina (SK-MEL-28, origen ATCC). Las células fueron crecidas en frascos de cultivo plásticos o en placas plásticas de 24 fosos, en un medio Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% y fueron mantenidas a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

*Compuestos ensayados* : Idebenona, provista por Droguería Saporiti, Argentina, lote 02107, con 99,80% de pureza calculado sobre droga seca. Hidroquinona (1,4- benzenediol), provista por Droguería Saporiti, Argentina, lote 010715, con 99,85% de pureza, calculado sobre droga seca.

Estudio de los compuestos *in vitro*: Células SK-MEL, levantadas con tripsina, fueron sembradas en placas plásticas de 24 fosos (densidad de 1 x 10<sup>5</sup> células por foso) e incubadas durante 24 horas en medio Eagle modificado (DMEM) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% previo al tratamiento con el compuesto a evaluar. Pasadas 24 horas, el medio fue reemplazado por 990 µl de medio fresco. A este último se le agregó 10 µl de vehículo estéril (50% de propilenglicol, 30% de etanol y 20% de agua destilada) conteniendo diferentes concentraciones de los compuestos a evaluar. Las células SK-mel toleraron bien el vehículo al 1% (concentración final: 0,5% de propilenglicol y 0,3% de etanol).

Se prepararon diluciones decimales de cada compuesto en el vehículo estéril para obtener concentraciones finales del

compuesto a estudiar de entre 1.000 y 0,01 µg/ml. Este procedimiento se repitió diariamente durante tres días.

El cuarto día, las células no fueron tratadas y en el quinto día, se ensayaron las células adherentes remanentes de acuerdo a los métodos descritos más adelante. De esta manera, las células estuvieron continuamente expuestas a los compuestos en estudio durante los 5 días que duró el cultivo. Todas las concentraciones de los compuestos fueron estudiadas por triplicado, comparándose la media de los 3 fosos tratados con los compuestos con los tratados con vehículo solamente.

*Determinación del contenido de melanina:* el contenido de melanina de las células SK-mel fue determinado luego de la remoción del medio de cultivo y del lavado de las células con PBS. Seguidamente, las células fueron lisadas mediante la adición de 1 ml de NaOH 1N a cada foso y pipeteo manual repetido. El extracto crudo de células fue analizado usando un espectrofotómetro a 400 y 475 nm para determinar el contenido de melanina y de dopaquinona, respectivamente. Los resultados fueron expresados como porcentaje de los cultivos celulares tratados con vehículo.

*Cuantificación del número celular con cristal violeta:* Se utilizó una tinción con solución acuosa de cristal violeta con el objeto de determinar, mediante métodos indirectos, el número de células adherentes al plástico sobrevivientes al tratamiento *in vitro*. Luego del período de tratamiento, se decantó el medio de los fosos por inversión de la placa y se lo reemplazó por 0,5 ml de cristal violeta al 0,1% (en etanol

10%) por foso. Las placas fueron teñidas durante 5 minutos a temperatura ambiente, sobre una plataforma rotatoria, con agitación suave. Seguidamente, el exceso de colorante fue decantado por inversión y la placa entera fue sumergida 4 veces en agua destilada en un envase adecuado. Luego de enjuagadas, las placas fueron invertidas y se las dejó escurrir sobre papel absorbente hasta remoción completa del exceso de agua. El cristal violeta retenido en las células adherentes fue más tarde extraído mediante el agregado de 1 ml de etanol (95%) por foso. Finalmente, las placas fueron colocadas sobre un agitador rotatorio durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las densidades ópticas de las muestras de alcohol fueron determinadas con la ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda = 590 nm) usando cubetas plásticas con etanol 95% como blanco. Cuando las densidades celulares fueron muy altas (por ejemplo, cuando las densidades ópticas fueron superiores a 2.0), se prepararon diluciones de cada muestra en etanol 95% y de esa manera fueron analizadas espectrofotométricamente.

20

Para determinar la fracción de células sobrevivientes al tratamiento en una concentración específica del agente en experimentación, la  $DO_{590}$  de los fosos tratados (promedio de tres determinaciones) fue dividida por la  $DO_{590}$  de los fosos utilizados con vehículo control (promedio de tres determinaciones). El porcentaje de sobrevivencia celular (expresado como porcentaje del vehículo control) fue obtenido multiplicando dicha fracción por 100.

*Determinación del contenido de melanina:* En la tabla VIII se muestran los valores promedio de la DO<sub>400</sub> y DO<sub>475</sub> de tres determinaciones simultáneas para diluciones de idebenona y de hidroquinona.

5

Tabla VIII

IDEBENONA		
Dilución	DO <sub>400</sub>	DO <sub>475</sub>
-1	0,0156	0,0011
-2	0,0140	0,0016
-3	0,0123	0,0043
-4	0,0096	0,0053
-5	0,0066	0,0040
Control	0,0236	0,0116

HIDROQUINONA		
Dilución	DO <sub>400</sub>	DO <sub>475</sub>
-1	0,007	0,0001
-2	0,012	0,0013
-3	0,021	0,0083
-4	0,036	0,0163
-5	0,034	0,0163
Control	0,033	0,0163

10 y, expresado como porcentajes:

IDEBENONA		
Dilución	DO <sub>400</sub>	DO <sub>475</sub>
-1	28%	9%
-2	40%	14%

-3	52%	37%
-4	59%	46%
-5	66%	35%
Control	100%	100%

HIDROQUINONA		
Dilución	DO <sub>400</sub>	DO <sub>475</sub>
-1	21%	0%
-2	36%	8%
-3	64%	51%
-4	109%	100%
-5	103%	100%
Control	100%	100%

De los resultados obtenidos, puede concluirse que, en el  
 5 modelo utilizado, el compuesto idebenona inhibe la síntesis  
 de melanina en forma dosis-dependiente. Si bien a  
 concentraciones altas el efecto de la idebenona podría ser  
 considerado similar al de la hidroquinona, luego de cierta  
 dilución, esta última deja de surtir efecto. Por el  
 10 contrario, el compuesto idebenona continúa inhibiendo, aún  
 bajo diluciones mayores.

La producción de dopaquinona también se ve afectada en forma  
 similar a la síntesis de melanina, indicando que la  
 15 inhibición es compleja, pudiendo producirse la inhibición en  
 varios sitios del camino metabólico de la melanina.

*Cuantificación del número celular con cristal violeta:* En la  
 siguiente tabla se resumen los porcentajes de células viables



luego del tratamiento con diferentes diluciones de idebenona y de hidroquinona.

Tabla IX

IDEBENONA	
Dilución	Porcentaje
-1	52%
-2	82%
-3	98%
-4	100%
-5	100%
Control	100%

HIDROQUINONA	
Dilución	Porcentaje
-1	34%
-2	58%
-3	77%
-4	89%
-5	95%
Control	100%

5

De los resultados obtenidos, puede concluirse que concentraciones elevadas de idebenona pueden ser tóxicas para las células. Asimismo, algo similar ocurre con la hidroquinona, aunque para esta última, la toxicidad fue mayor. Dado que esta toxicidad podría interferir con la lectura de las densidades ópticas de la melanina y de la dopaquinona, se desarrollaron experimentos similares utilizando otras diluciones, diferentes tiempos de incubación y utilizando solamente la idebenona (ya que los efectos de la hidroquinona sobre este sistema ya se encuentran descritos en

10

15

la bibliografía) . Los mismos se describen en los ejemplos siguientes.

**Ejemplo N°6**

5 **Inhibición de la melanogénesis luego de 1 día de tratamiento con idebenona**

Con el objeto de establecer si la idebenona inhibe la melanogénesis en células en cultivo se diseñó un experimento similar al descrito en el ejemplo anterior, pero en este caso las células fueron tratadas durante 1 sólo día, mientras que los resultados fueron evaluados al tercer día. Asimismo, se evaluó mediante la utilización de un microscopio invertido, la presencia o ausencia de efectos citopáticos sobre los cultivos celulares, comenzándose con una dilución -2 y llegando a la dilución -6.

En la tabla X se observan las densidades ópticas 400 y 475 (para melanina y dopaquinona, respectivamente) de las distintas diluciones ensayadas, y sus respectivos porcentajes.

Tabla X

Dilución	DO <sub>400</sub>	Porcentaje	DO <sub>475</sub>	Porcentaje
-2	0,0040	14,65%	0,0030	18,75%
-3	0,0133	48,72%	0,0050	31,25%
-4	0,0243	89,01%	0,0123	76,87%
-5	0,0343	125,64%	0,0196	122,5%

-6	0,0313	114,65%	0,0200	125,0%
Control	0,0273	100%	0,0160	100%

De estos resultados se infiere que la idebenona comienza a inhibir tanto la síntesis de melanina como la de sus subproductos (por ejemplo dopaquinona) a las 24 horas de tratamiento, en una forma dosis dependiente. En este experimento no se tomó en cuenta la dilución -1 por presentar efectos citopáticos los cultivos. Las restantes diluciones no mostraron efecto citopático alguno, por lo que puede considerarse que la idebenona a las dosis utilizadas no es citotóxica. Es de destacar que las diluciones -5 y -6 presentaron mayor cantidad de melanina y dopaquinona que los controles. Esto podría deberse simplemente a un error del método y, por lo tanto, no ser significativo. Sin embargo, sin querer quedar atado a una teoría en particular, existiría la posibilidad que con el tiempo de incubación utilizado y a estas diluciones, el compuesto idebenona pueda ejercer un efecto estimulante de la melanogénesis, el que probablemente sea pasajero.

#### 20 Ejemplo N°7

##### Inhibición de la melanogénesis luego de 2 días de tratamiento con idebenona

25 Con el objeto de establecer si la idebenona inhibe la melanogénesis en células en cultivo se diseñó un experimento similar al descrito en el ejemplo anterior, pero en este caso las células fueron tratadas durante 2 días y al cuarto

día se evaluaron los resultados. día. Asimismo, se evaluó mediante la utilización de un microscopio invertido, la presencia o ausencia de efectos citopáticos sobre los cultivos celulares, evaluando únicamente las diluciones -4, -5 y -6.

En la tabla XI se observan las densidades ópticas 400 y 475 (para melanina y dopaquinona, respectivamente) de las distintas diluciones ensayadas, y sus respectivos porcentajes.

Tabla XI

Dilución	DO <sub>400</sub>	Porcentaje	DO <sub>475</sub>	Porcentaje
-4	0,0613	112,89%	0,0400	103,62%
-5	0,0626	115,28%	0,0406	105,18%
-6	0,0396	72,92%	0,0273	70,72%
Control	0,0386	100%		

Estos resultados indicarían que existe una estimulación de la síntesis de melanina en las diluciones -4 y -5, aun cuando la dilución -6 muestra una inhibición. Esto podría estar indicando que la estimulación, de existir, seguiría durante el 2º día de tratamiento, aunque los valores encontrados se asemejan mucho a los valores de los controles, y la dilución -6 muestra inhibición tal como la esperada. No se observó efecto citopático.

**Ejemplo N°8****Inhibición de la melanogénesis luego de 3 días de tratamiento con idebenona**

5

Con el objeto de establecer si la idebenona inhibe la melanogénesis en células en cultivo se diseñó un experimento similar al descrito en el ejemplo anterior, pero en este caso las células fueron tratadas durante 3 días y al quinto día se evaluaron los resultados. Asimismo, mediante la utilización de un microscopio invertido, se evaluó la presencia o ausencia de efectos citopáticos sobre los cultivos celulares, evaluando únicamente las diluciones -4, -5 y -6.

15

En la tabla XII se observan las densidades ópticas 400 y 475 (para melanina y dopaquinona, respectivamente) de las distintas diluciones ensayadas, y sus respectivos porcentajes.

20

*Tabla XII*

Dilución	DO <sub>400</sub>	Porcentaje	DO <sub>475</sub>	Porcentaje
-4	0,0686	77,69%	0,0513	80,66%
-5	0,0742	84,03%	0,0612	96,22%
-6	0,0801	90,71%	0,0643	101,10%
Control	0,0883	100%	0,0636	100%



Estos resultados indicarían que al tercer día de tratamiento existe una inhibición de la síntesis de melanina en forma dosis dependiente. La cantidad de dopaquinona en la dilución -6 es similar al control. No se observó efecto citopático.

5

### Ejemplo N°9

#### Inhibición de la melanogénesis mediada por idebenona a altas diluciones

10

Con el objeto de establecer el efecto sobre la melanogénesis en células en cultivo, producido por bajas concentraciones de idebenona, se diseñó un experimento similar al descrito en el ejemplo 6 pero utilizando diluciones -2, -3, -4, -5, -6, -7 y -8.

15

En la tabla XIII se observan las densidades ópticas 400 y 475 (para melanina y dopaquinona, respectivamente) de las distintas diluciones ensayadas, y sus respectivos porcentajes.

20

Tabla XIII

Dilución	DO <sub>400</sub>	Porcentaje	DO <sub>475</sub>	Porcentaje
-2	0,01166	71,40%	0,0024	14,45%
-3	0,01566	95,89%	0,0038	22,89%
-4	0,01533	93,87%	0,0133	80,12%
-5	0,01466	89,77%	0,0139	83,73%
-6	0,00900	55,11%	0,0116	69,87%

-7	0,01166	71,40%	0,0139	83,73%
-8	0,01166	71,40%	0,0133	80,12%
Control	0,01633	100%	0,0166	100%

Los resultados indican el compuesto idebenona, aún cuando se encuentra muy diluido, conserva su capacidad inhibitoria sobre la melanogénesis. No obstante, no se logró demostrar una clara relación dosis-respuesta.

#### Ejemplo N°10

- 10 Capacidad depigmentante de una crema conteniendo idebenona al 2,5%, en una paciente con cloasma del embarazo.

Paciente de sexo femenino, de 43 años de edad, de nacionalidad peruana, con ascendencia incaica y de piel trigueña tipo III, quien manifiesta haber tenido un embarazo y un parto hace 9 años y que durante el segundo trimestre de embarazo presentó una mancha gravídica (cloasma del embarazo), en forma de alas de mariposa, sobre ambas regiones malares de su cara, mancha que persiste hasta la actualidad y que incrementa su pigmentación durante los meses de verano por exposición al sol, de bordes bien definidos y contrastantes con la piel circundante.

Tratamiento: se le indicó a la paciente colocar en el sitio de la mancha, una cantidad suficiente de crema conteniendo idebenona al 2,5%, de acuerdo al ejemplo 1, en forma diaria antes de dormir, dejando la crema colocada durante toda la

noche y enjuagando la cara con abundante agua y jabón neutro a la mañana siguiente. La aplicación se realizó durante 20 días consecutivos. La paciente fue revisada clínicamente a los 7, 14 y 21 días de iniciado el tratamiento, comparando la zona pigmentada con la piel circundante.

Resultados: Paulatinamente, se observó una disminución general de la pigmentación de la piel hiperpigmentada, la cual se hizo notoria hacia el día 21, aunque sin llegar a la obtención de un color similar a la piel sin hiperpigmentación. Los bordes de la mácula pigmentada se atenuaron, borrándose, dejando de ser marcados e inconfundibles, presentando una degradación desde la zona central del cloasma hacia la piel circundante.

Conclusiones: la crema conteniendo idebenona al 2,5% es efectiva para atenuar la pigmentación cutánea del cloasma gravídico, entidad caracterizada por una hiperpigmentación localizada de probable etiología hormonal. Aunque el tratamiento fue discontinuado, los resultados indican que la continuación del tratamiento podría llevar a la desaparición completa de la hiperpigmentación.

#### EJEMPLO 11

Capacidad depigmentante de una crema conteniendo idebenona al 2,5% en una paciente con hiperpigmentación post-inflamatoria.

Paciente de sexo femenino, de 40 años de edad, de nacionalidad argentina y de piel blanca tipo II, quien

- presenta un daño fotoactínico importante y que manifiesta haber tenido 3 embarazos y tres partos hace 9, 11 y 14 años y que luego de un proceso de depilación con cera de su bozo, presenta en la zona traumatizada una hiperpigmentación residual de más de 3 años de evolución, que persiste hasta la actualidad, incrementando su pigmentación durante los meses de verano por exposición al sol, de bordes bien definidos, contrastantes con la piel circundante.
- 5
- 10 Tratamiento: se le indicó a la paciente colocar en el sitio de la mancha, una cantidad suficiente de crema conteniendo idebenona al 2,5% de acuerdo al ejemplo 1, en forma diaria antes de dormir, dejando la crema colocada durante toda la noche y enjuagando la cara con abundante agua y jabón neutro
- 15 a la mañana siguiente. La aplicación se realizó durante 20 días consecutivos. La paciente fue revisada clínicamente a los 7, 14 y 21 días de iniciado el tratamiento, comparando la zona pigmentada con la piel circundante. Se le indicó a la paciente que se abstenga de exponerse de manera directa a la
- 20 radiación solar durante todo el tratamiento.

Resultados: A los 7 días de comenzado el tratamiento se apreció una disminución general de la pigmentación de la piel hiperpigmentada, que se hizo notoria hacia el día 14, y hacia

25 el día 21, la zona hiperpigmentada modificó sus bordes, disminuyendo el tamaño de la mácula, en forma irregular. Los bordes de la mácula pigmentada se atenuaron, borrándose en sectores.

Conclusiones: la crema conteniendo idebenona al 2,5% es efectiva para atenuar la pigmentación cutánea post-inflamatoria, entidad caracterizada por una hiperpigmentación localizada consecuente con un proceso inflamatorio dérmico.

- 5 Aunque el tratamiento fue discontinuado, los resultados indican que la continuación del tratamiento podría llevar a la desaparición completa de la hiperpigmentación.

10 **EJEMPLO 12**

Capacidad depigmentante de una crema conteniendo idebenona al 5%, en una paciente con hiperpigmentación post-medicamentosa

15

Paciente de sexo femenino, de 46 años de edad, de nacionalidad argentina y de piel trigueña tipo III, quien manifiesta haber tenido 1 embarazo y 1 parto hace 8 años y que padece de psoriasis en placas en ambos codos. La paciente

20 manifiesta que luego de un tratamiento con psoralenos presentó máculas hiperpigmentadas en ambos codos, sobre las cuales aún se desarrollan placas de psoriasis, que remiten y exacerban, dejando siempre la base hiperpigmentada más extensa que el área afectada por la psoriasis. La

25 hiperpigmentación se encontraría fija desde hace aproximadamente 5 años.

Tratamiento: se le indicó a la paciente colocar en el sitio de la mancha, una cantidad suficiente de crema conteniendo

30 idebenona al 5% de acuerdo al ejemplo 1, en forma diaria

antes de dormir, dejando la crema colocada durante toda la noche y enjuagando el sitio de aplicación con abundante agua y jabón neutro a la mañana siguiente. La aplicación se realizó durante 15 días consecutivos. La paciente fue  
5 revisada clínicamente a los 7 y 15 días de iniciado el tratamiento, comparando la zona pigmentada con la piel circundante. Se le indicó a la paciente que se abstenga de exponerse de manera directa a la radiación solar durante todo el tratamiento. Luego de haber pasado 6 meses de realizado el  
10 tratamiento, se realizó una nueva comparación de la zona pigmentada con la piel circundante.

Resultados: A los 7 días de comenzado el tratamiento se  
15 observó una disminución general de la pigmentación de la piel hiperpigmentada, la que se hizo más notoria hacia el día 15, disminuyendo el tamaño y color de las áreas hiperpigmentadas y adquiriendo el color de la piel circundante.

20 Conclusiones: la crema conteniendo idebenona al 5% es efectiva para atenuar la pigmentación cutánea post-medicamentosa.

### EJEMPLO 13

25

#### Estudio de Estabilidad en Estante de una Formulación conteniendo Idebenona 0,3%

30 Se estudio la estabilidad de dos formulaciones elaboradas en fechas diferentes, pero de idéntica composición. Ambas se

encontraban formuladas en forma de crema acuosa (O/W) conteniendo Idebenona 0,3%:

La formulación más antigua analizada fue envasada en un pote  
5 de poliestireno blanco y fue almacenada en estante, por un lapso de 600 días, a temperatura ambiente y al abrigo de la luz.

Tabla XIV: Fórmula cuantitativa de una crema acuosa (O/W)  
10 conteniendo idebenona 0.3%. Cantidades para 100 gramos.

COMPONENTES	% EN PESO
Agua	79,7
Cera Autoemulsionable no iónica	6.00
Vaselina	5.00
Glicerina	5.00
Miristato de Isopropilo	2.00
Alcohol Cetílico	1,50
Metilparabeno (Nipagin)	0,20
Propilparabeno (Nipasol)	0,10
Idebenona	0,3

La metodología utilizada para la cuantificación del principio  
15 activo fue espectrofotometría UV-Vis.

Se obtuvo una diferencia no significativa en la valoración del principio activo, para las cremas más recientes (1 mes desde su elaboración) y las más antiguas (20 meses desde su



elaboración). Se concluye que esta crema puede ser considerada estable durante al menos 600 días (20 meses)

#### EJEMPLO 14

5

#### Estudio de Estabilidad en Estante de una Formulación conteniendo Idebenona 3%

10 Se estudio la estabilidad de dos formulaciones elaboradas en  
fechas diferentes, pero de idéntica composición. Ambas se  
encontraban formuladas en forma de crema acuosa (O/W)  
conteniendo Idebenona 3%:

15 La formulación más antigua analizada fue envasada en un pote  
de poliestireno blanco y fue almacenada en estante, por un  
lapso de 600 días, a temperatura ambiente y al abrigo de la  
luz.

20 *Tabla XV: Fórmula cuantitativa de una crema acuosa (O/W)  
conteniendo idebenona 3%. Cantidades para 100 gramos.*

COMPONENTES	% EN PESO
Agua	79,7
Cera Autoemulsionable no iónica	6.00
Vaselina	5.00
Glicerina	5.00
Miristato de Isopropilo	2.00
Alcohol Cetílico	1,50
Metilparabeno (Nipagin)	0,20

Propilparabeno (Nipasol)	0,10
Idebenona	3,00

La metodología utilizada para la cuantificación del principio activo fue espectrofotometría UV-Vis.

- 5 Se obtuvo una diferencia no significativa en la valoración del principio activo, para las cremas más recientes (1 mes desde su elaboración) y las más antiguas (20 meses desde su elaboración). Se concluye que esta crema puede ser considerada estable durante al menos 600 días (20 meses)

REIVINDICACIONES

1. Uso de la idebenona en una composición destinada a ser aplicada sobre la piel, caracterizado porque se la utiliza para inhibir la melanogénesis.  
5
2. Uso de la idebenona en una composición destinada a ser aplicada sobre la piel, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se la utiliza para disminuir la coloración de la piel o aclarar la misma en el sitio de aplicación.  
10
3. Uso de la idebenona en una composición destinada a ser aplicada sobre la piel, de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque se la utiliza para producir despigmentación de la piel en el sitio de aplicación.  
15
4. Uso de la idebenona en una composición cosmética, farmacéutica y/o dermatológica destinada a ser aplicada sobre la piel, de acuerdo con la reivindicación 1 caracterizado porque se la utiliza para producir despigmentación de la piel en sitios pigmentados debido a desórdenes de la piel.  
20
5. Uso de la idebenona de acuerdo con la reivindicación 4 caracterizado porque los desórdenes de la piel se seleccionan entre psoriasis, rosácea, piel fotodañada, dermatitis atópica, hiperpigmentación post-medicamentosa, hiperpigmentación post-inflamatoria, cloasma del embarazo y dermatitis seborreica.  
25  
30

6. Una composición cosmética, farmacéutica y/o dermatológica destinada a ser aplicada sobre la piel caracterizada porque comprende idebenona o un derivado de la misma y porque la idebenona o su derivado se encuentra en una cantidad efectiva para producir la depigmentación de la piel.
7. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 caracterizada porque comprende idebenona o un derivado de la misma y porque la idebenona o su derivado se encuentra en una cantidad comprendida entre 0.1% y 10% p/p.
8. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 caracterizada porque comprende idebenona o un derivado de la misma y porque la idebenona o su derivado se encuentra en una cantidad comprendida entre 0.3% y 5% p/p.
9. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque se encuentra en forma de parche oclusivo.
10. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque se encuentra en forma de crema.

11. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque se encuentra en forma de gel.
- 5 12. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque se encuentra en forma de emulsión.
- 10 13. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque se encuentra en forma de aerosol.
- 15 14. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque la idebenona se encuentra liposomada, complejada o en un sistema de liberación controlada.
- 20 15. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7 caracterizada porque además comprende componentes oleosos y componentes hidrosolubles.
- 25 16. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 14 caracterizada porque comprende cera autoemulsionable, vaselina, miristato de isopropilo y alcohol cetílico.
- 30 17. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 14 caracterizada porque comprende glicerina, metilparabeno y propilparabeno.

18. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 14 caracterizada porque además comprende agentes beneficiosos para la piel, filtros  
5 y/o pantallas solares.

19. Una composición destinada a ser aplicada sobre la piel de acuerdo con la reivindicación 14 caracterizada porque además comprende agentes antioxidantes cosmética y/o  
10 farmacéuticamente aceptables.

20. Un método para el tratamiento de la pigmentación de la piel no deseada caracterizado porque comprende colocar en el sitio pigmentado una composición que comprenda una dosis  
15 despigmentante efectiva de idebenona, dejar actuar durante toda la noche y enjuagar por la mañana.